

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah penelitian *true experimental* (eksperimental murni) di laboratorium secara *in vivo*. Penelitian dilakukan dengan desain *post test only* pada kelompok perlakuan dan kontrol. Pengelompokan objek eksperimen dilakukan dengan desain randomisasi sederhana.

4.2 Populasi dan Replikasi Penelitian

4.2.1 Populasi Target

Replikasi penelitian adalah tikus Wistar betina (*Rattus norvegicus*) berusia 3 bulan. Tikus diperoleh dengan pembelian dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.2 Replikasi Penelitian

4.2.2.1 Kriteria Inklusi

1. Tikus putih galur wistar berjenis kelamin betina.
2. Usia 3 bulan, yang kemudian diaklimatisasi/diadaptasi selama satu minggu. Usia tikus dikonfirmasi dengan catatan kelahiran tikus yang didapat dari penjual.
3. Berat badan tikus 200-350 gram.
4. Tikus sehat dan aktif

4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

1. Tikus yang mati dalam pemeliharaan penelitian.
2. Tikus yang tidak mau makan, tidak mau minum.
3. Tikus yang tampak sakit dan tidak aktif .
4. Tikus yang keluar dan hidup di luar kandang pemeliharaan.
5. Terdapat luka atau tanda radang pada tubuh tikus.

4.2.3 Pembagian Kelompok Replikasi

Replikasi dikelompokkan dengan menggunakan teknik randomisasi sederhana pada tikus yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak memenuhi kriteria eksklusi penelitian. Masing masing tikus diberi nomor identitas. Lalu nomor-nomor tersebut ditulis ulang di beberapa kertas. Kemudian kertas dikocok dan lima kertas yang dijatuhkan dicocokkan dengan nomor tikus untuk menentukan pembagian perlakuan pada sampel per kelompok.

4.2.4 Penentuan Besar Replikasi

Penentuan besar sampel untuk penelitian eksperimental dengan rancangan randomisasi kompleks menggunakan rumus Federer:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

t = banyaknya kelompok perlakuan

r = jumlah ulangan

Penelitian ini menggunakan lima kelompok perlakuan ($p=5$), sehingga jumlah pengulangan (jumlah sampel) yang dibutuhkan adalah :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(5-1)(r-1) \geq 15;$$

$$r-1 \geq 15:4;$$

$$r = 3.75 + 1 = 4.75$$

Dari perhitungan tersebut maka dibutuhkan jumlah ulangan (*sample size*) sebanyak kurang lebih 5 ekor tikus untuk tiap kelompok perlakuan, sehingga jumlah tikus yang dibutuhkan untuk 5 perlakuan pada penelitian ini adalah 25 ekor tikus.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian dilakukan selama 58 hari, mulai bulan April - Juni 2017.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah:

1. Nikotin dengan dosis 0,25 mg/kgBB
2. Nikotin dengan dosis 0,5 mg/kgBB
3. Nikotin dengan dosis 0,75 mg/kgBB

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar deoxypyridinoline serum.

4.5 Definisi Operasional

1. Bilateral oovorektomi adalah prosedur operasi pembedahan yang dilakukan untuk mengambil 2 buah ovarium.
2. Nikotin yang digunakan dalam penelitian ini adalah nikotin murni dari Sigma Aldrich.
3. Kelompok kontrol negatif adalah kelompok yang tidak mendapatkan perlakuan bilateral oovorektomi dan terapi.
4. Kelompok kontrol positif (Ovx)/bilateral oovorektomi adalah kelompok yang mendapatkan perlakuan bilateral oovorektomi dan dirawat tanpa perlakuan selama 6 minggu.
5. Kelompok larutan nikotin dosis 1 (D1) adalah kelompok yang mendapat perlakuan bilateral oovorektomi, kemudian diikuti dengan pemberian nikotin 0,25 mg/kgBB.
6. Kelompok larutan nikotin dosis 2 (D2) adalah kelompok yang mendapat perlakuan bilateral oovorektomi, kemudian diikuti dengan pemberian nikotin 0,5 mg/kgBB.
7. Kelompok larutan nikotin dosis 3 (D3) adalah kelompok yang mendapat perlakuan bilateral oovorektomi, kemudian diikuti dengan pemberian nikotin 0,75 mg/kgBB.

8. Analisa kadar deoxypyridinoline serum adalah pemeriksaan kadar deoxypyridinoline dengan menggunakan ELISA KIT pada serum.

4.6 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan untuk Perawatan Hewan Coba

Alat-alat yang dibutuhkan yaitu kandang pemeliharaan hewan coba berupa baskom dengan penutup kandang berupa jaring-jaring kawat sebanyak 25 buah, tempat minum tikus 25 buah, tempat makan, timbangan analitik, dan tempat sampah. Bahan-bahan yang dibutuhkan antara lain makanan tikus, sekam, air minum tikus.

4.6.2 Pengenceran dan Pemberian Larutan nikotin

Larutan nikotin murni, normal saline, kertas saring, kain flanel 1x1 meter, pipet tetes, objek glass, pendingin.

4.6.3 Alat dan Bahan untuk Perlakuan Bilateral Oovorektomi

Alat: meja operasi, baki plastik, handscoen, spuit, alat cukur, duk steril, benang catgut, pisau tajam, jarum jahit, kasa steril, plester, kapas. Bahan: ketamin, betadine solution dan alkohol 70%, basitrasin serbuk, gentamisin injeksi dan novalgine injeksi.

4.6.4 Alat dan Bahan untuk Pembedahan Hewan Coba

Alat: vacutainer, gunting bedah 4, pinset 2, jarum pentul 2 set, kertas label, kapas. Bahan : alkohol 70%, kloroform 20 ml.

4.6.5 Penghitungan Kadar Deoxypiridinoline Serum dengan ELISA Kit

Deoxypiridinoline Serum ELISA Kit, reagen.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Perawatan Tikus

Dilakukan persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan hewan coba, penutup kandang dengan jaring-jaring kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, pakan, dan seleksi tikus (usia, berat badan, jenis kelamin, kesehatan). Tikus diadaptasikan di dalam laboratorium biokimia selama tujuh hari dan dibagi menjadi 5 (lima) kelompok.

4.7.2 Prosedur Bilateral Oovorektomi

Seluruh tikus, kecuali kelompok kontrol negatif diberi perlakuan bilateral oovorektomi. Tikus betina umur 3 bulan dianastesi dengan menggunakan ketamin IM dengan dosis 40mg/kg BB. Bulu abdomen dicukur kira-kira 1 cm garisan di atas ovarium, lalu dilakukan sterilisasi menggunakan alkohol 70% dan betadine solution. Kemudian dilakukan insisi transabdominal di atas uterus sepanjang 1,5-2 cm. Oviduk bagian distal dan ovarium diligasi kemudian diangkat. Luka potongan diberi Basitrasin serbuk (Nebacetin). Prosedur yang sama dilakukan untuk ovarium kanan. Luka insisi dijahit dengan catgut kemudian diolesi Betadine dan Nebacetin, lalu ditutup dengan kasa steril. Kemudian diberikan Gentamisin i.m dengan dosis 60-80 mg/kgBB 1 kali perhari selama 3 hari dan Novalgin i.m dengan dosis 0,3 ml selama 1 hari (Raden,2011).

4.7.3 Pemberian Larutan Nikotin

Pada penelitian ini digunakan dosis nikotin yang menggunakan dasar dari penelitian Park, J., Kang, J. W., dan Lee, S. M. (2013), yang menemukan bahwa dosis nikotin 1 mg/KgBB pada mencit dapat menurunkan ROS. Maka pada penelitian ini digunakan dosis setengahnya karena ekstrapolasi dari dosis mencit ke dosis tikus (Freireich, 1966). Kelompok yang diberikan larutan nikotin mulai diterapi dengan larutan nikotin setelah proses penyembuhan luka pasca bilateral oovorektomi (3 minggu). Pemberian nikotin dilakukan secara per oral menggunakan sonde. Perlakuan dilakukan selama 25 hari dengan kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif tidak diberi nikotin. Lalu kelompok D1 diberi nikotin 0,25 mg/kgBB, kelompok D2 diberi nikotin 0,5 mg/kgBB dan kelompok D3 diberi nikotin 0,75 mg/kgBB setiap hari selama 25 hari.

4.7.4 Pembedahan Tikus

Pembedahan dilakukan dengan inhalasi menggunakan kloroform dalam suatu wadah tertutup. Darah diambil terlebih dahulu dengan spuit 3 ml melalui jantung sebagai sampel untuk pengukuran kadar deoxypyridinoline serum.

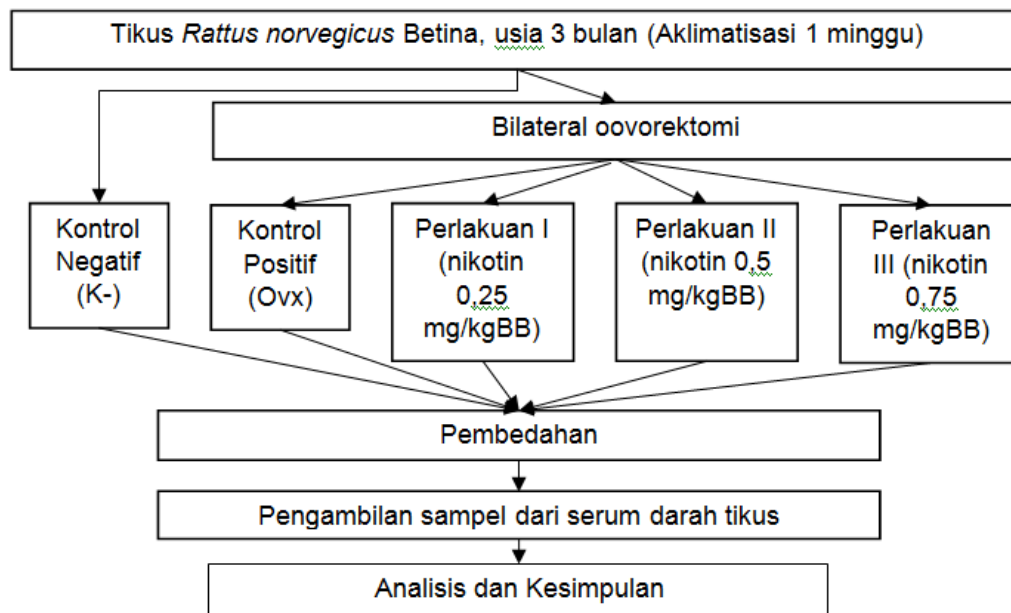
4.7.5 Pengukuran Kadar Deoxypyridinoline pada Serum

Serum yang sudah di kumpulkan pada tikus dilakukan pengukuran kadar deoxypyridinoline pada serum dengan menggunakan ELISA KIT yang spesifik untuk deoxypyridinoline serum pada tikus yaitu Rat DPD (Deoxypyridinoline) ELISA Kit dengan nomor katalog E-EI-R0327.

4.8 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data

Pengambilan data dilakukan setelah pembedahan. Data yang diperoleh akan dilakukan uji normalitas untuk mengetahui persebaran data normal atau tidak. Kemudian uji varian dilakukan untuk menentukan varian data sama (homogen) atau tidak. Lalu dilakukan uji *One-way ANOVA* dan *Post hoc test* (uji *Tukey HSD*) yang kemudian dilanjutkan dengan uji regresi linier. Seluruh uji statistik memiliki tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Semua analisis statistik menggunakan SPSS versi 11.

4.9 Bagan Alur Penelitian



Gambar 4.1 Bagan alur penelitian